

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 278**

21 Número de solicitud: 201631369

51 Int. Cl.:

A01N 65/08 (2009.01)
A01N 65/18 (2009.01)
A01N 65/22 (2009.01)
A01N 65/28 (2009.01)
A01P 21/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

25.10.2016

30 Prioridad:

02.02.2016 MX MX/a/2016/001466

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.08.2017

Fecha de concesión:

27.10.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.11.2017

73 Titular/es:

GREENCORP BIORGANIKS DE MEXICO S.A. DE C.V. (100.0%)
BLVD. LUIS DONALDO COLOSIO, NUMERO 1858,
COLONIA SAN PATRICIO
25204 SALTILLO, COAHUILA MX

72 Inventor/es:

YAÑEZ REYES, Jesús Noel

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **FORMULACIÓN BIOESTIMULANTE DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL E INDUCTORA DE RESISTENCIA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS FITOPATÓGENOS Y MÉTODO DE PREPARACIÓN**

57 Resumen:

Formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos y método de preparación. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos está compuesta por extractos y aceites vegetales provenientes de variedades de plantas del semidesierto Chihuahuense y aceites absolutos y extractos de plantas aromáticas, entre otros componentes. Un método para preparar la formulación bioestimulante que comprende preparación de la base de la formulación, adición de una premezcla que contiene extractos etanólicos de plantas, hormonas y reguladores de crecimiento vegetal y adición de extracto metanólico de *Eucalyptus globulus*, adición de una premezcla que contiene aceites absolutos y adición de extracto acetónico de *Larrea tridentata* y adición de una premezcla que contiene extractos hexánicos y de un agente acondicionador.

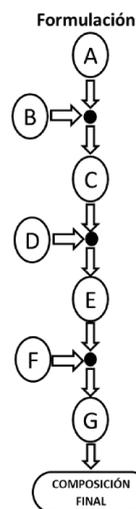


Fig. 1

ES 2 628 278 B2

**FORMULACIÓN BIOESTIMULANTE DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL E
INDUCTORA DE RESISTENCIA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR
VIRUS FITOPATÓGENOS Y MÉTODO DE PREPARACIÓN**

5

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se sitúa en el área de la biotecnología y atañe particularmente al campo de la biotecnología agrícola. Se refiere al uso de extractos de plantas y otros productos de origen natural para preparar una formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades de plantas son la causa de las mayores pérdidas económicas en la agricultura alrededor del mundo (Martinelli *et al.*, 2015). Los virus causan muchas enfermedades en plantas de importancia internacional y son responsables de grandes pérdidas en términos de producción y calidad en los cultivos, aunque es difícil calcular esas pérdidas económicas se ha estimado que representan más de 30 mil millones de dólares anuales (Sastry y Zitter, 2014).

Los virus son patógenos estrictamente intracelulares, por lo que su control resulta complicado y las principales medidas para su control están ligadas a la destrucción de las plantas infectadas o a el uso excesivo de pesticidas para el control de los organismos que funcionan como vectores de los virus (Nicaise, 2014). Prácticamente no existen compuestos antivirales capaces de curar las enfermedades virales en las plantas y las medidas de control actuales sólo pueden mitigar o prevenir su ocurrencia (Gergerich y Dolja, 2006).

El primer paso requerido para el manejo de enfermedades virales es la identificación del virus. La estrategia de manejo subsiguiente dependerá de la forma por la cual un determinado virus ingresa al cultivo, de cómo el virus es transmitido entre las plantas de un mismo cultivo, y de cómo el virus sobrevive en ausencia del cultivo (Haddidi *et al.*, 1998). Algunas medidas preventivas incluyen el uso de semillas u órganos vegetativos certificados libres de virus, la eliminación de los posibles

reservorios del virus en la vegetación silvestre circundante y la modificación de prácticas de siembra y cosecha. Si el virus tiene un vector de transmisión conocido, el control o exclusión del vector es sumamente importante, por ejemplo: los nematodos, insectos y hongos vectores que pueden controlarse con nematicidas, insecticidas y fungicidas, respectivamente (Gergerich y Dolja,
5 2006).

No obstante una alternativa para el control de los virus puede encontrarse en la propia evolución de las plantas, la cual les ha provisto de mecanismos de resistencia a través de las interacciones planta-virus. En las últimas décadas se han desarrollado procesos en la identificación y entendimiento del rol de las fitohormonas y otros componentes clave en la respuesta de las plantas
10 al estrés biótico (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Partiendo de esta idea, se pueden seleccionar diversos ingredientes de origen natural para integrar una alternativa para inducir la defensa de las plantas a daños por virus a través de la activación de los mecanismos de resistencia sistémica adquirida (Delaney *et al.*, 1994).

Tradicionalmente se ha descrito el uso de diversos extractos vegetales con aplicaciones diversas,
15 siendo una de ellas el desarrollo de productos a base de extractos vegetales que permitan el favorable desarrollo de las plantas, así como la inducción de resistencia contra diversos fitopatógenos. Para ello se han descrito en el estado del arte varias tecnologías, como la que describe la solicitud de patente internacional WO 1989009200 A1, que se refiere al uso del extracto de *Viscum álbium* o muérdago blanco como parte de una composición para el
20 acondicionamiento de suelos y fertilizante de hojas que permite restaurar los nutrientes del suelo y la regeneración de éstas últimas. Además se ha reportado también el uso de extractos de *Viscum álbium* en combinación con otros compuestos activos o extractos, tal es el caso de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2014/0364309 A1, en la que se emplean extractos de *Aloe vera* y algas marinas para reducir el daño en plantas y sus frutos causado por insectos, parásitos y otros
25 fitopatógenos, que no incluyen virus.

La solicitud de patente internacional WO 2006097700 A1 hace referencia al uso individual o combinado de aceites esenciales de plantas como eucalipto (*Eucalyptus globulus*), hierbabuena (*Mentha piperita*), clavo (*Syzygium aromaticum*) u orégano (*Lippia graveolens*), en combinación con aceite vegetal y un agente emulsificador para mejorar el crecimiento de plantas. De igual
30 manera en diversos documentos de patente de Estados Unidos se han empleado extractos de *Coriandrum sativum* con diversas aplicaciones: en el primero de ellos, la patente US 8202557 B,

se ha usado para preparar insecticidas, mientras que en la solicitud de patente US 2006/0194698 A1 se hace referencia a fitoquímicos activos para proteger a las plantas de malezas, plagas y fitopatógenos; y aunque también se han descrito propiedades antivirales para los extractos de *Coriandrum sativum*, como en la patente estadounidense US 8529968 B2, no se han ligado a virus
5 fitopatógenos.

Por otra parte, en los últimos años y debido a la demanda de productos que permitan estimular el crecimiento de las plantas así como aumentar al mismo tiempo el espectro de protección contra patógenos (virus, bacterias y hongos) se han desarrollado una serie de compuestos químicos, así como una nueva generación de productos llamados bioestimulantes, los cuales contienen diversas
10 sustancias y/o microorganismos que cuando se aplican a las plantas o la rizosfera mejoran el desarrollo del cultivo y las respuestas al estrés biótico. Algunos bioestimulantes se describen en las solicitudes de patente internacionales WO 2014020187 A1, WO 2013030422 A1 y WO 2012045189 A2, en la primera de ellas, los bioestimulantes están elaborados a partir de compuestos de origen mineral o animal y extractos de algas; en la solicitud de patente WO
15 2013030422 A1 se emplean residuos procedentes de la fabricación de la cerveza para la producción de bioestimulantes; mientras que en la solicitud WO 2012045189 A2 los bioestimulantes están hechos a base de quitosano e hidrolizados de *Sacharomyces cerevisiae*.

A pesar de que se ha descrito un amplio uso de diversos extractos vegetales y aceites esenciales de plantas con actividad antiviral, pocos han sido probados directamente sobre cultivos agrícolas y
20 específicamente con virus fitopatógenos.

Algunos otros productos bioestimulantes que se encuentran actualmente en el mercado están elaborados a base de glutatión, oligosacarinas y combinaciones de extractos y aceites de plantas que proporcionan cierta efectividad en el combate contra los virus, sin embargo ninguno de ellos describe la combinación de extractos y sustancias que integran la presente invención y que
25 permiten tener un efecto sinérgico para combatir virus de ADN y ARN de mayor impacto en la producción de cultivos de hortalizas y frutas. Entre las principales ventajas técnicas de la invención se señalan las siguientes: previene y reduce el daño por virus, aminora el número de plantas dañadas, retrasa la aparición de síntomas por virosis, disminuye significativamente la severidad del daño, reduce la diseminación del virus en la plantación, favorece la continuidad del
30 crecimiento en las plantas y asegura un mayor rendimiento en condiciones de ataque.

En vista de los antecedentes en el estado de la técnica, el problema técnico que resuelve la presente invención es proporcionar una formulación basada en el uso de diversos extractos vegetales y aceites esenciales de plantas para elaborar un producto con acción bioestimulante del crecimiento y desarrollo de las plantas e inductora de resistencia a virus fitopatógenos, la cual
 5 tiene las características de ser sustentable para su aplicación y segura para la salud de vertebrados e invertebrados y de bajo impacto para el medio ambiente, lo cual hace que la presente invención sea novedosa, inventiva y con una aplicación concreta en el campo de la agricultura.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación basada en el uso diversos extractos vegetales y aceites esenciales de plantas para elaborar un producto con aplicación agronómica. Dichos extractos vegetales y aceites esenciales comprenden: extractos etanólico y acetónico de *Larrea tridentata*, extractos etanólico de *Viscum álbum*, aceite absoluto de *Lippia graveolens* y extractos hexánicos de *Euphorbia antisyphilitica*, *Jatropha dioica* y *Agave americana*,
 15 aceites de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*, extracto metanólico de *Eucaliptus globulos*, extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Menta piperita*, y extracto etanólico de *Coriandrum sativum*. Adicionalmente, la formulación incluye compuestos azufrados, aminoácidos y péptidos específicos de origen vegetal y animal, hormonas y reguladores de crecimiento vegetal, multi-vitaminas y polisacáridos.

20 Otro objeto de la invención es proporcionar una formulación que tiene actividad bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal, principalmente en plantas de las familias *Solanáceas*, *Cucurbitáceas*, *Rosáceas*, *Leguminosas*, *Alliáceas*, *Caricaceas*, y *Musaceas*, entre otras de interés comercial.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una alternativa a la prevención y reducción
 25 del daño asociado a enfermedades de plantas causadas por virus fitopatógenos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una alternativa para inducir la resistencia de las plantas a enfermedades causadas por virus fitopatógenos, de tipo ADN y ARN.

Otro objeto de la presente invención incluye proporcionar un proceso de elaboración de una formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 muestra un diagrama de proceso para la preparación de la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos objeto de la presente invención, que está conformado por las etapas A – G.

10 La Figura 2 muestra un gráfico que describe el efecto de la formulación objeto de la presente invención sobre el índice de severidad del virus anular de la papaya (PRSV) en plantas de papaya var. Maradol con tratamientos de la formulación a diversas dosis: la línea con el marcador  representa la dosis de 0.50 L/ha; la línea con el marcador  representa la dosis 0.70 L/ha; mientras que la línea con el marcador  representa una dosis de 1.00 L/ha. Estas observaciones fueron realizadas con respecto a un testigo sin aplicación .

15 La Figura 3 muestra fotografías de las partes aéreas de plantas de papaya var. Maradol en campo, infectadas por el virus anular de la papaya (PRSV), para comparar el índice de severidad antes (Día 0) y después del tratamiento (Día 28) con la formulación objeto de la invención a diversas dosis (0.50, 0.70 y 1.00 L/ha) con respecto a un testigo sin aplicación.

20 La Figura 4 muestra fotografías de plantas de pimiento con síntomas de virosis en campo, antes (Día 0) y después de la aplicación de la formulación objeto de la presente invención (Día 8 y Día 18) a dosis menores de 1.00 L/ha.

25 La Figura 5 muestra un gráfico comparativo de la altura media de las plantas de tomate como parámetro de crecimiento para diversos tratamientos. T1: control positivo; T2: control comercial a dosis de 2 mL/L por planta; T3, T4 y T5: tratamiento con la formulación objeto de la presente invención a dosis de 2.50 mL/L, 3.75 mL/L y 5.00 mL/L por planta, respectivamente.

La Figura 6 muestra un gráfico comparativo del número medio de hojas por planta de tomate como parámetro de crecimiento para diversos tratamientos. T1: control positivo; T2: control comercial a dosis de 2 mL/L por planta; T3, T4 y T5: tratamiento con la formulación objeto de la presente invención a dosis de 2.50 mL/L, 3.75 mL/L y 5.00 mL/L por planta, respectivamente.

La Figura 7 muestra fotografías de plantas del cultivo de tomate no tratadas con la formulación de la presente invención al inicio (Día 0) y a los 36 días de evaluación a nivel campo.

La Figura 8 muestra fotografías de plantas del cultivo de tomate tratadas con la formulación de la presente invención al inicio (Día 0) y a los 36 días de evaluación a nivel campo.

5 La Figura 9 muestra fotografías de plantas del cultivo de pimiento no tratadas con la formulación de la presente invención al inicio (Día 0) y a los 36 días de evaluación a nivel campo.

La Figura 10 muestra fotografías de plantas del cultivo de pimiento tratadas con la formulación de la presente invención al inicio (Día 0) y a los 36 días de evaluación a nivel campo.

10 La Figura 11 muestra las imágenes de electroforesis en geles de agarosa del análisis de detección de virus de DNA del género *Begomovirus* (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Pepper Huasteco yellow vein virus* (PHYVV)) en plantas del cultivo de tomate al inicio (Día 0) y a los 36 días de la evaluación.

15 La Figura 12 muestra las imágenes de electroforesis en geles de agarosa del análisis de detección de virus de DNA del género *Begomovirus* (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Pepper Huasteco yellow vein virus* (PHYVV)) en plantas del cultivo de pimiento al inicio (Día 0) y a los 36 días de la evaluación.

La Figura 13 muestra las imágenes de electroforesis en geles de agarosa del análisis de detección de virus de RNA del género *Torradovirus* (ToMarV) en plantas del cultivo de tomate al inicio (Día 0) y a los 36 días de la evaluación.

20 La Figura 14 muestra las imágenes de electroforesis en geles de agarosa del análisis de detección de virus de RNA del género *Torradovirus* (ToMarV) en plantas del cultivo de pimiento al inicio (Día 0) y a los 36 días de la evaluación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La propuesta de la invención atañe al uso de extractos y aceites vegetales preparados a partir de hojas, raíces, tallos y corteza de especies vegetales provenientes de biotipos regionales específicos de plantas silvestres y endémicas del semidesierto Chihuahuense, para diseñar una formulación con acción bioestimulante del crecimiento de las plantas e inductora de resistencia a

virus fitopatógenos al contar con fitomoléculas promotoras de la resistencia local y Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) en plantas infectadas con virus.

La formulación objeto de la presente invención consiste de una mezcla de múltiples extractos de especies vegetales que no son atacadas por virus por lo cual se aprovechan diversas propiedades que impactan en la formulación final, ya que los compuestos activos están presentes en las cortezas, tallos, raíces y hojas de dichas especies.

La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos, objeto de la presente invención comprende esencialmente los siguientes componentes:

10 a) Extractos y aceites vegetales provenientes de variedades de plantas del semidesierto Chihuahuense, tales como: extractos etanólico y acetónico de *Larrea tridentata*, extracto etanólico de *Viscum álbum*, aceite absoluto de *Lippia graveolens* y extractos hexánicos de *Euphorbia antisyphilitica*, *Jatropha dioica* y *Agave americana*.

15 b) Aceites absolutos y extractos de plantas aromáticas, tales como aceites de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*, extracto metanólico de *Eucalyptus globulos*, extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Menta piperita*, y extracto etanólico de *Coriandrum sativum*.

20 c) Compuestos azufrados, aminoácidos y péptidos específicos de origen vegetal y animal tales como: sulfatiazol, laurilsulfato de sodio, tiosulfatos de calcio, fenilalanina, péptidos de leche de soya y de claras de huevo.

d) hormonas y reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas, ácido salicílico, jasmonatos, sus precursores, derivados y sales, entre otros.

e) Multivitaminas y polisacáridos proporcionados por gel de sábila.

25 Para obtener los diferentes extractos que componen la invención se emplean métodos convencionales descritos en el estado del arte.

La preparación de la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos consiste en agregar los componentes verificando que cada uno de ellos esté debidamente disuelto y homogéneo antes

de proseguir a la agregación del siguiente material. La preparación se realiza en agitación constante y al realizarse de esta manera no causa reacciones exotérmicas, ni requiere de algún tipo de inducción. Debido a la naturaleza fisicoquímica de algunos de sus componentes, es necesario preparar por separado algunas pre-mezclas para favorecer su incorporación a la formulación final. Para preparar la formulación se agregan los componentes lentamente de acuerdo al orden que se describe a continuación y que es esquematizado en la Figura 1, se indica además las concentraciones de cada componente de la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos. El proceso considera las etapas siguientes (Figura 1):

- 10 A) Preparación de la base de la formulación, que está compuesta inicialmente por los extractos acuosos y los componentes solubles en agua. Los componentes de la formulación base son los siguientes y se adicionan en orden secuencial:
- Extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Extracto acuoso de *Menta Piperita* (0.75 – 1.25 % v/v)
 - 15 - Extracto acuoso de *Salvia officinalis* (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Leche de Soya (1.5 – 2.5 % v/v)
 - Clara de Huevo (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Gel de Sábila (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Sulfatiazol (0.375 – 0.625 % p/v)
 - 20 - Fenilalanina (0.75 – 1.25 % p/v)
 - Tiosulfato de Calcio (15.0 – 25.0 % p/v)
- B) Preparación de la Premezcla 1, que contiene los componentes de polaridad media-alta: extractos etanólicos de plantas, hormonas y reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas, ácido salicílico, sus precursores, derivados y sales, entre otros:
- 25 - Ext. etanólico de *Larrea tridentata* (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Ext. etanólico de *Viscum álbum* (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Ext. etanólico de *Coriandrum sativum* (0.75 – 1.25 % v/v)
 - Ácido Naftoxiacético (0.15 – 0.25 % p/v)
 - 6 Bencilaminopurina (0.225 – 0.375 % p/v)
 - 30 - Ácido Salicílico (1.5 – 2.5 % p/v)
- C) La Pre-mezcla 1 se adiciona a la formulación base en agitación constante. Y posteriormente se adicionan otros componentes de polaridad media, tal como:

- Ext. metanólico de *Eucalyptus globulus* (0.75 – 1.25 % v/v)

D) Preparación de la Premezcla 2, que contiene los aceites absolutos:

- Aceite de *Syzygium aromaticum* (0.75 – 1.25 % v/v)
- Aceite de *Cinnamomum zeylanicum* (0.75 – 1.25 % v/v)
- Aceite de *Lippia graveolens* (0.75 – 1.25 % v/v)

E) Se adiciona la Premezcla 2 a la formulación base en agitación constante. A continuación se adicionan otros componentes de polaridad media, tal como:

- Ext. acetónico de *Larrea tridentata* (0.75 – 1.25 % v/v)

F) Preparación de la Premezcla 3, que contiene los extractos de menor polaridad (extractos hexánicos), tales como:

- Ext. hexánico de *Euphorbia antisyphilitica* (0.75 – 1.25 % v/v)
- Ext. hexánico de *Jatropha dioica* (0.75 – 1.25 % v/v)
- Ext. hexánico de corteza de *Agave americana* L (0.75 – 1.25 % v/v)

G) Adición de la Premezcla 3 a la formulación base con agitación constante para la obtención de la formulación final. Para realizar la formulación se emplea un agente acondicionador, tal como Lauril sulfato de sodio (7.5 – 12.5 % p/v).

Una vez obtenida la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos, ésta es envasada y almacenada de manera adecuada para su uso.

La formulación obtenida, con actividad bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos previene y reduce el daño por virus de ADN y ARN de mayor impacto en la producción de cultivos de hortalizas y frutas, aminora el número de plantas dañadas, retrasa la aparición de síntomas por virosis, disminuye significativamente la severidad del daño, reduce la diseminación del virus en la plantación, favorece la continuidad del crecimiento en las plantas y asegura un mayor rendimiento en condiciones de ataque. Las aplicaciones de la formulación objeto de la invención, quedan comprobadas en diversos ensayos realizados para el control de virus fitopatógenos en distintas especies vegetales.

EJEMPLOS

A manera no limitativa de la presente invención, se describen a continuación los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1. Preparación de la formulación

Para preparar un lote de 1000 L de la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos, se procedió a mezclar los componentes en agua purificada de acuerdo al proceso previamente descrito y que es esquematizado en el diagrama de la Figura 1, manteniendo agitación constante entre la adición de un componente y otro. Los componentes y las cantidades empleadas específicamente para este ejemplo se enlistan a continuación:

- 10 - Extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (9 L)
- Extracto acuoso de *Menta Piperita* (7.5 L)
- Extracto acuoso de *Salvia officinalis* (7.5 L)
- Leche de Soya (25 L)
- Clara de Huevo (7.5 L)
- 15 - Gel de Sábila (10 L)
- Sulfatiazol (4.5 Kg)
- Fenilalanina (0.8 Kg)
- Tiosulfato de Calcio (150 Kg)
- Premezcla 1:
- 20 Ext. etanólico de *Larrea tridentata* (9 L)
- Ext. etanólico de *Viscum álbum* (8 L)
- Ext. etanólico de *Coriandrum sativum* (8 L)
- Ácido Naftoxiacético (1.5 Kg)
- 6 Bencilaminopurina (2.5 Kg)
- 25 Ácido Salicílico (17 Kg)
- Ext. metanólico de *Eucalyptus globulus* (8 L)
- Premezcla 2:
- Aceite de *Syzygium aromaticum* (7.5 L)
- Aceite de *Cinnamomum zeylanicum* (7.5 L)
- 30 Aceite de *Lippia graveolens* (7.5 L)
- Ext. acetónico de *Larrea tridentata* (9 L)

- Premezcla 3:
 - Ext. hexánico de *Euphorbia antisiphilitica* (8 L)
 - Ext. hexánico de *Jatropha dioica* (8 L)
 - Ext. hexánico de corteza de *Agave americana* L (7.5 L)
- 5 - Lauril sulfato de sodio (85 Kg)

Una vez obtenida la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos, ésta es envasada y almacenada de manera adecuada para su uso. A partir de esta formulación se procedieron a realizar las pruebas de desempeño contra diversos virus fitopatógenos que corresponden a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 2. Actividad antiviral de la formulación contra el virus PRSV en papaya

El Virus de la mancha anular de la papaya PRSV (Papaya Ringspot Virus) es un virus cuyo genoma es de ARN de cadena simple. Para evaluar la efectividad de la formulación objeto de esta invención en el control del virus PRSV, se utilizaron plantas de papaya cv. Maradol de un año de edad, con síntomas de PRSV, a las cuales se les hizo un diagnóstico aleatorio por la técnica de ELISA, para corroborar la presencia del virus. Se evaluaron tres dosis de la formulación a 0.50, 0.75 y 1.00 L/ha y un testigo absoluto (sin aplicación). Se realizaron tres aplicaciones sucesivas a intervalos de 7 días entre las mismas. Las aplicaciones se realizaron con una mochila, con capacidad de 15 litros, con un gasto de agua de 500 L/ha.

El diseño experimental fue totalmente al azar con 12 repeticiones y la unidad experimental fue una planta. El marco de plantación fue a una distancia entre hileras de 3.0 m y entre plantas 2.0 m, con una densidad de 1,670 plantas/ha.

Para evaluar la severidad se efectuaron cinco evaluaciones, la primera al momento de la primera aplicación y las siguientes a intervalos de 7 días. En cada fecha se registró la severidad de la enfermedad de cada planta, de acuerdo a la escala propuesta por Rivas-Valencia et al., (2003):

- 1 = Planta sana.
- 2 = Inicio de síntomas (moteado amarillo, algunas manchas aceitosas poco definidas).
- 3 = Síntomas bien definidos, no generalizado en las hojas, mancha aceitosa definida.
- 4 = Síntomas severos, generalizado en las hojas, anillos concéntricos en frutos.
- 30 5 = Síntomas muy severos, anillos concéntricos en frutos y reducción de lámina foliar.

6 = Muy severo con detención de crecimiento y muerte de la planta.

Con esta calificación nominal de severidad por planta, se obtuvo el índice poblacional de severidad al aplicar la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{\sum X_{ki}(N_{ki})}{N_j}$$

Dónde:

- 5 IS = índice de severidad;
 X_{ki} = nivel del daño en el momento i;
 N_{ki} = número de plantas con el nivel del daño en el momento i, y
 N_j = número total de plantas evaluadas.

10 Los valores del índice de severidad se transformaron a porcentaje, con la finalidad de ajustarlos y analizar el comportamiento de la curva. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

15 La estrategia de control del virus PRSV-P con el empleo de la formulación objeto de esta invención fue exitosa, ya que logró disminuir la severidad final del virus en la plantación en 64% para los tratamientos 1 y 2 (dosis alta e intermedia, 1.00 y 0.75 L/ha, respectivamente) y en 70% para el tratamiento 3 (dosis baja 0.50 L/ha), mientras que el tratamiento sin aplicación (testigo) aumentó en un 25% la severidad de la enfermedad (Figura 2). Los valores de severidad de la enfermedad mostraron diferencias significativas con respecto al testigo a partir de la segunda aplicación del producto en cualquiera de sus dosis.

20 Como se puede apreciar en la Figura 2, a los 14 días (después de dos aplicaciones) la remisión de síntomas fue observada en el tratamiento de la dosis más baja (0.50 L/ha), y hubo disminución de la enfermedad en el tratamiento de 0.75 L/ha. A partir de la cuarta evaluación (después de tres aplicaciones) se comenzó a observar remisión de síntomas en las plantas de papaya a las dosis de 1.00 L/ha y 0.75 L/ha y en la quinta evaluación se apreció la remisión de síntomas en los tres tratamientos con las dosis del producto, sin que hubiera diferencias significativas en este momento
 25 entre ellos. El testigo por su parte incrementó su índice de severidad en un 25%.

Estos resultados son consistentes con lo observado en las imágenes de la Figura 3, donde 28 días después del tratamiento ocurre la remisión total de síntomas si se utilizan al menos tres aplicaciones sucesivas cada 7 días entre 0.50 y 1 L/ha, no ocurriendo así en el testigo.

Adicionalmente, ninguna de las dosis aplicadas de la formulación mostró efecto de toxicidad para el cultivo de papaya durante el estudio.

Ejemplo 3. Actividad de la formulación como inductor de resistencia a virosis del pimiento a nivel invernadero.

5 El pimiento es una de las plantas hortícolas que ha sufrido implacablemente la incidencia de enfermedades de etiología viral. Con la finalidad de demostrar que la formulación objeto de esta invención puede minimizar el daño de virosis e inducir resistencia en la planta se realizó un estudio cualitativo sobre plantas de pimiento que presentan síntomas de virosis. La prueba consistió en la aplicación de la formulación en una dosis inicial de 0.70 L/ha, seguida de una segunda aplicación a la misma dosis 5 días después; posteriormente se realizaron una tercera y cuarta aplicación a 10 a dosis de 0.40 L/ha, pero con un espaciamento de diez días entre ellas. Las aplicaciones se realizaron con una mochila, con capacidad de 15 litros.

El efecto de la formulación sobre las plantas de pimiento con síntomas de virosis fue positivo y se observó a los 8 días del tratamiento, mejorando hacia el día 18 después de la primera aplicación (Figura 4). Esto indica que la aplicación de la formulación vía foliar con dosis menores a 1.00 L/ha y con aplicaciones cada 5 días es efectiva para inducir la resistencia sistémica en plantas con síntomas causados por agentes virales a partir de la segunda aplicación. La aplicación de la formulación objeto de la presente invención permite que las plantas continúen su desarrollo de manera normal sin mostrar efectos de toxicidad sobre el cultivo de pimiento.

20 **Ejemplo 4. Desempeño de la formulación contra el virus de las hojas amarillas del tomate TYLCV.**

Se evaluó la eficacia de la formulación objeto de la presente invención para inducir resistencia al virus de la cuchara, o virus de las hojas amarillas del tomate TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), durante la fase de crecimiento vegetativo de un cultivo de tomate desarrollado bajo invernadero en clima semiárido. El virus TYCLV es un virus de tipo ADN y es transmitido por una población de mosca blanca denominada *Bemisia tabaci*, especie de hemíptero de la familia *Aleyrodidae*.

Las pruebas se realizaron en un invernadero tipo multitúnel de 420 m² de superficie, que dispone de ventilación lateral y cenital pasiva mediante ventanas, con sistema de apertura y cierre

automatizado. El invernadero cuenta con un suelo enarenado, formado por una capa de tierra aportada de 30 cm de espesor colocada sobre el suelo original de la finca, y cubierta por una capa de estiércol de unos 3 cm de espesor sobre la que se encuentra una capa de arena fina de 10 cm de espesor, a modo de acolchado. Para el riego y la fertilización del cultivo se dispone de
5 instalación de riego por goteo, con los ramales porta goteros ubicados en líneas pareadas con una distancia de 1.2 m entre pares de líneas de goteros pareadas y de 0.8 m entre los dos pares de líneas de goteros adyacentes, y con los emisores dentro del mismo ramal porta goteros ubicados cada 50 cm. La instalación de riego por goteo dispone de goteros autocompensantes con un caudal unitario de 3 litros hora⁻¹ gotero⁻¹. Para la programación del fertirriego se dispone de un
10 programador de riego y de 5 tanques de solución nutritiva concentrada. La densidad de plantación utilizada será de 1.5 plantas m⁻².

Para realizar la prueba se analizaron 5 diferentes tratamientos. En cada uno ellos se realizaron las pruebas a 90 plantas de tomate diferentes y por tres repeticiones, formada cada una de ellas por 30 plantas por repetición, cada repetición del tratamiento es en bloques al azar para eliminar
15 posibles errores experimentales derivados de diferentes tasas de infección en función de la distribución de las condiciones climáticas al interior del invernadero.

La evaluación se realiza en un periodo de cuatro semanas en las cuales se aplican con una frecuencia semanal cada tratamiento. Se realizaron dos aplicaciones previamente a la inoculación de las plantas con el virus TYCLV y dos posteriores a la misma. A continuación se muestran las
20 actividades realizadas en cada uno de los tratamientos:

- Día 0: Trasplante
- Día 7: Entutorado y destallado
- Día 9: Primera aplicación de tratamientos
- Día 14: Destallado
- Día 16: Segunda aplicación de tratamientos
- Día 20: Inoculación
- Día 22: Tercera aplicación de tratamientos
- Día 29: Cuarta aplicación de los tratamientos
- Día 35: Muestreo de parámetros de crecimiento

A continuación se describe la metodología que se empleó para la inoculación del cultivo: una vez que el cultivo estuvo establecido (transcurridos 20 días después del trasplante) fue inoculado con una población del insecto plaga *Bemisia tabaci* (portador del virus TYCLV), para lo cual se introdujeron en el interior del invernadero, junto a cada una de las parcelas experimentales, una
5 planta de tomate infectada por el virus TYCLV y una población de adultos de mosca blanca *ad libitum*. De esta forma se fomentó la inoculación del cultivo de tomate por el virus TYCLV durante un periodo de tiempo de 5 días, periodo durante el cual se mantuvo dicho material vegetal infectado en el interior del invernadero. Transcurrido este periodo de tiempo, dicho material vegetal fue retirado del invernadero.

10 Los tratamientos que se realizaron se describen a continuación:

- Tratamiento 1: Control positivo de plantas sin infección;
- Tratamiento 2: Plantas con aplicaciones periódicas con un producto comercial ampliamente utilizado en la zona de estudio a la dosis recomendada por el fabricante (REzist® 2 mL/L);
- 15 • Tratamiento 3: Plantas con aplicaciones periódicas de la formulación objeto de la presente invención a la dosis de 2.50 mL/L por planta;
- Tratamiento 4: Plantas con aplicaciones periódicas de la formulación objeto de la presente invención a la dosis de 3.75 mL/L por planta;
- Tratamiento 5: Plantas con aplicaciones periódicas de la formulación objeto de la
20 presente invención a la dosis de 5.00 mL/L por planta.

El muestreo de parámetros de crecimiento, posterior a la cuarta aplicación de los tratamientos, consistió en la medición de dos características: la altura de la planta y el número de hojas desarrolladas. Esta medición se realizó en una parcela por repetición y por tratamiento, formada por cinco plantas por parcela. Se esta manera es posible identificar las plantas que sufran
25 alteraciones del crecimiento como consecuencia de haber manifestado la sintomatología habitual del virus TYCLV.

Los resultados de los parámetros de crecimiento en lo referente a la altura de la planta son esquematizados en la Figura 5, en la que es posible observar que a partir de la aplicación de una dosis mayor a 3.75 mL/L por planta de la formulación objeto de la presente invención (Tratamientos
30 4 y 5) se obtiene un mejor desarrollo de la altura de la planta de tomate infectada con el virus

TYCLV, de aquella que se obtiene con el control comercial (Tratamiento 2). Destacando la dosis de 5.00 mL/L en la que el desarrollo de la altura de la planta es incluso mayor que en el control positivo. Indicando la actividad bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de la formulación.

- 5 En cuanto a los resultados de los parámetros de crecimiento en lo que se refiere al número de hojas desarrolladas por planta en cada tratamiento, fue posible identificar que la formulación objeto de la presente invención en cualquiera de sus dosis permite un mayor desarrollo de hojas por planta que el control comercial (Figura 6); y que para el caso de una aplicación a dosis de 3.75 mL/L por planta, la formulación tiene un desempeño similar al control positivo, esto indica
10 nuevamente la actividad de la formulación como bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos.

Ejemplo 5. Actividad de la formulación como inductor de resistencia a virosis del tomate y pimiento a nivel campo.

- 15 Con la finalidad de demostrar que la formulación objeto de esta invención puede minimizar el daño de virosis e inducir resistencia en plantas, se realizó un estudio sobre plantas de tomate y pimiento a nivel campo que presentaban síntomas de virosis. La prueba consistió en la aplicación de la formulación en una dosis de 0.5 L/ha en suelo y posteriormente se realizaron cuatro aplicaciones más vía foliar con un espaciamento de siete días entre ellas. Las aplicaciones se realizaron con
20 una mochila, con capacidad de 15 litros. Como control se tomaron en cuenta plantas de tomate y pimiento sin la aplicación de la formulación de la presente invención. El porcentaje de incidencia viral se determinó mediante la observación visual del daño causado en las plantas de cultivos de tomate y pimiento a nivel campo.

- El efecto de la formulación sobre las plantas del cultivo de tomate con síntomas de virosis fue
25 positivo y al inicio de la evaluación se observó una incidencia viral del 31 % y a los 36 días del tratamiento se disminuyó hasta un 8.7 % donde las plantas presentaron un vigoroso rendimiento de follaje (Figura 8). Las plantas del cultivo de tomate que no fueron tratadas con la formulación de la presente invención presentaron al inicio de la evaluación una menor incidencia viral del 7.3 %, pero a los 36 días mostraron un mayor daño en el rendimiento y follaje vegetal (Figura 7).

Los resultados de la formulación sobre las plantas del cultivo de pimiento también fueron positivos, donde al inicio de la evaluación se observó una incidencia viral del 11 % y a los 36 días del tratamiento se disminuyó hasta un 5.7 % presentando un mayor rendimiento de follaje (Figura 10). Se observó que las plantas del cultivo de pimiento que no fueron tratadas con la formulación de la presente invención mostraron una tendencia similar a las del tomate, debido a que al inicio de la evaluación presentaron una menor incidencia viral del 7.2 %, pero a los 36 días mostraron un mayor daño en el rendimiento y follaje vegetal (Figura 9).

Esto indica que la aplicación de la formulación en suelo y posteriormente vía foliar con una dosis de 0.5 L/ha cada 7 días es efectiva para inducir la resistencia sistémica en plantas de cultivos de tomate y pimiento a nivel campo con síntomas causados por agentes virales. La aplicación de la formulación objeto de la presente invención permite que las plantas continúen su desarrollo de manera normal sin mostrar efectos de toxicidad sobre plantas de cultivos de tomate y pimiento a nivel campo.

Ejemplo 6. Detección molecular de virus de DNA en plantas de cultivos de tomate y pimiento.

Con la finalidad de demostrar que la formulación objeto de la presente invención puede minimizar el daño de virosis e inducir resistencia en plantas, se realizó un estudio para detectar molecularmente la presencia de virus de DNA del género *Begomovirus* en plantas de tomate y pimiento a nivel campo. Primeramente las semillas de tomate y pimiento se lavaron con etanol al 70 % durante dos minutos y cloro al 30 % durante 15 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en charolas con sustrato para su germinación en invernadero.

Después de tres a cuatro semanas posterior a la germinación las plantas de tomate y pimiento fueron inoculadas con el virus de DNA del género *Begomovirus* (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Pepper Huasteco yellow vein virus* (PHYVV)) por agro infiltración inoculando 2 mL de DNA. La aplicación de la formulación de la presente invención se realizó cinco días posteriores a la inoculación de las semillas empleando una dosis de 0.5 L/ha.

La detección molecular de los virus de TYLCV and PHYVV se llevó a cabo al inicio de la aplicación (Día 0) y a los 36 días de la aplicación de la formulación de la presente invención. Primeramente se llevó a cabo la extracción de DNA de las hojas apicales de cada planta del cultivo de tomate y pimiento de manera individual en base a la metodología del CTAB al 3% (Zhang *et al.*, 1998).

Posteriormente se realizó una detección molecular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de manera semicuantitativa, con la idea de analizar de manera indirecta el grado de replicación de los virus. Los productos amplificados se muestran en imágenes mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 11 y Figura 12).

5 Los resultados obtenidos en las imágenes de electroforesis en geles de agarosa al 1 % demostraron que la detección molecular de los virus de DNA del género *Begomovirus* (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Pepper Huasteco yellow vein virus* (PHYVV)) en plantas del cultivo de tomate fue cualitativamente menor a los 36 días de evaluación en comparación con el tiempo inicial de la evaluación (Día 0) (Figura 11), por lo que la formulación de la presente invención evitó
10 el avance de la sintomatología viral mejorando el rendimiento del follaje de las plantas del cultivo de tomate a nivel campo.

Las imágenes de electroforesis en geles de agarosa al 1 % demostraron que la detección molecular de los virus de DNA del género *Begomovirus* (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Pepper Huasteco yellow vein virus* (PHYVV)) en plantas de pimiento continúa hasta los 36 días de
15 evaluación (Figura 12), sin embargo la formulación de la presente invención también logró evitar el avance de la sintomatología viral mejorando el rendimiento del follaje de las plantas del cultivo de pimiento a nivel campo.

Ejemplo 7. Detección molecular de virus de RNA en plantas de cultivos de tomate y pimiento a nivel campo.

20 Con la finalidad de demostrar que la formulación objeto de la presente invención puede minimizar el daño de virosis e inducir resistencia en plantas, se realizó un estudio para detectar molecularmente la presencia de virus de RNA del género *Torradovirus* (ToMarV) en plantas de tomate y pimiento a nivel campo. Primeramente las semillas de tomate y pimiento se lavaron con etanol al 70 % durante dos minutos y cloro al 30 % durante 15 minutos, posteriormente se lavaron
25 con agua destilada estéril y se colocaron en charolas con sustrato para su germinación en invernadero.

Después de tres a cuatro semanas posteriores a la germinación las plantas de tomate y pimiento fueron inoculadas con el virus del género *Torradovirus* (ToMarV), por agro infiltración inoculando 2 mL de DNA. La aplicación de la formulación de la presente invención se realizó cinco días
30 posteriores a la inoculación de las semillas empleando una dosis de 0.5 L/ha.

La detección molecular de los virus se llevó a cabo al inicio de la aplicación (Día 0) y los 36 días posteriores a la aplicación de la formulación de la presente invención. Primeramente se llevó a cabo la extracción de RNA de tejido foliar sintomático de cada planta de tomate y pimiento de manera individual según el protocolo descrito por Singh (2002) modificado con sulfito de sodio.

5 Posteriormente se realizó la detección molecular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos (primers ToMarV-F/ToMarV-R (Verbeek *et al.*, 2008) los cuales amplifican un fragmento de 511 pb) para cada uno de los virus.

Para incrementar la sensibilidad en la detección de ToMarV se realizó un PCR anidado utilizando los primers pJER-1123 y pJER-1124 (Camacho *et al.*, 2015), los cuales amplifican un fragmento de 10 332 pb utilizando como templado o molde el DNA obtenido durante el primer PCR. El producto de PCR anidado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 13 y Figura 14).

Las imágenes de electroforesis en geles de agarosa al 1 % demostraron que la detección molecular simple y anidada del virus de RNA del género *Torradovirus* (ToMarV) en plantas de tomate continúa hasta los 36 días de evaluación (Figura 13), sin embargo la formulación de la 15 presente invención logró evitar el avance de la sintomatología viral mejorando el rendimiento del follaje de las plantas del cultivo de tomate a nivel campo.

Los resultados obtenidos en las imágenes de electroforesis en geles de agarosa al 1 % demostraron que la detección molecular anidada del virus de RNA del género *Torradovirus* (ToMarV) en plantas de pimiento fue similar al inicio (Día 0) y a los 36 días de evaluación (Figura 20 14). Y la detección molecular simple del virus de RNA del género *Torradovirus* (ToMarV) fue cualitativamente menor a los 36 días de evaluación en comparación con el tiempo inicial de la evaluación (Día 0) (Figura 14), por lo que la formulación de la presente invención logró evitar la tasa de replicación del virus y el avance de la sintomatología viral mejorando el rendimiento del follaje de las plantas del cultivo de pimiento a nivel campo.

25

REIVINDICACIONES

1. Una formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos, caracterizada porque
5 comprende:
- a) Extractos y aceites vegetales provenientes de variedades de plantas del semidesierto Chihuahuense,
 - b) Aceites absolutos y extractos de plantas aromáticas,
 - c) Compuestos azufrados, aminoácidos y péptidos específicos de origen vegetal y animal,
 - 10 d) hormonas y reguladores de crecimiento vegetal, y
 - e) multivitaminas y polisacáridos.
2. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 1,
15 caracterizada porque los extractos y aceites vegetales provenientes de variedades de plantas silvestres y endémicas del semidesierto Chihuahuense se seleccionan del grupo siguiente: *Larrea tridentata*, *Viscum álbum*, *Lippia graveolens*, *Euphorbia antisyphilitica*, *Jatropha dioica* y *Agave americana*.
- 20 3. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada porque los aceites absolutos y extractos de plantas aromáticas se seleccionan del grupo siguiente: *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulos*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Menta piperita* y *Coriandrum sativum*.
- 25 4. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada porque los compuestos azufrados, aminoácidos y péptidos de origen vegetal y animal, incluyen: sulfatiazol, laurilsulfato de sodio, tiosulfatos de calcio, fenilalanina, péptidos de
30 leche de soya y de claras de huevo.
5. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 1,

caracterizada porque las hormonas y reguladores de crecimiento vegetal se seleccionan del grupo: auxinas, giberelinas, ácido salicílico, jasmonatos, sus precursores, derivados y sales, entre otros.

5 6. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada porque las multivitaminas y polisacáridos son aportados por gel de sábila.

10 7. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductor de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque posee propiedades en la regulación del desarrollo y crecimiento vegetal.

15 8. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductor de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque posee propiedades para la bioestimulación de las defensas e inducción de resistencia de las plantas a virus fitopatógenos del tipo ARN y ADN.

20 9. La formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductor de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque posee propiedades para la bioestimulación de las plantas cultivadas de las familias *Solanáceas*, *Cucurbitáceas*, *Rosáceas*, *Leguminosas*, *Aliáceas*, *Caricáceas* y *Musáceas*, entre otras de interés comercial.

25 10. Un método para preparar una formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos, caracterizado porque consta de los pasos siguientes:

- a) Preparación de la base de la formulación, que consiste en la adición secuencial con agitación constante de extractos acuosos de plantas y componentes solubles en agua.
- b) Preparación de la Premezcla 1, que contiene extractos etanólicos de plantas, hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.
- 30 c) Adición de la Premezcla 1 y del extracto metanólico de *Eucalyptus globulus* a la formulación base en agitación constante.
- d) Preparación de la Premezcla 2, que contiene los aceites absolutos.

e) Adición de la Premezcla 2 y del extracto acetónico de *Larrea tridentata* a la formulación base que contiene la premezcla 1 en agitación constante.

f) Preparación de la Premezcla 3, que contiene los extractos hexánicos.

5 g) Adición de la Premezcla 3 y de un agente acondicionador a la formulación base que contiene las premezclas 1 y 2 en agitación constante.

11. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque los extractos acuosos comprenden: extracto
10 acuoso de *Rosmarinus officinalis*, extracto acuoso de *Menta Piperita* y extracto acuoso de *Salvia officinalis*.

12. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de
15 acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque los componentes solubles comprenden: leche de soya, clara de huevo, gel de sábila, sulfatiazol, fenilalanina y tiosulfato de calcio.

13. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de
20 acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque los extractos etanólicos comprenden: extracto etanólico de *Larrea tridentata*, extracto etanólico de *Viscum álbum* y extracto etanólico de *Coriandrum sativum*.

14. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e
25 inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque las hormonas y reguladores del crecimiento vegetal comprenden: ácido beta Naftoxiacético, 6-bencilaminopurina, ácido salicílico, sus precursores, derivados o sales.

30 15. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque los aceites absolutos se seleccionan del

grupo: aceite de *Syzygium aromaticum*, aceite de *Cinnamomum zeylanicum* y aceite de *Lippia graveolens*.

- 5 16. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque los extractos hexánicos comprenden: extracto hexánico de *Euphorbia antisyphilitica*, extracto hexánico de *Jatropha dioica* y extracto hexánico de *Agave americana* L.
- 10 17. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque el agente acondicionador es preferentemente lauril sulfato de sodio.
- 15 18. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 10, 11, 13, 15 y 16 caracterizado porque los extractos de plantas y los aceites absolutos se agregan en un intervalo de concentración de 0.75 a 1.25 % v/v.
- 20 19. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 10 y 12 caracterizado porque la leche de Soya, la clara de Huevo y el gel de Sábila se agregan en un intervalo de 0.75 a 2.5 % v/v.
- 25 20. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 10 y 12 caracterizado porque el sulfatiazol, la fenilalanina y el tiosulfato de calcio se agregan en un intervalo de concentración de 0.075 a 25.0 % p/v.
- 30 21. El método para preparar la bioestimulación del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 10 y 14 caracterizado porque los reguladores del crecimiento se agregan en un intervalo de concentración de 0.15 a 2.5 p/v.

22. El método para preparar la formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia para el control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos de acuerdo a las reivindicaciones 10 y 17 caracterizado porque el acondicionador se agrega en un
5 intervalo de concentración de 7.5 – 12.5 p/v.

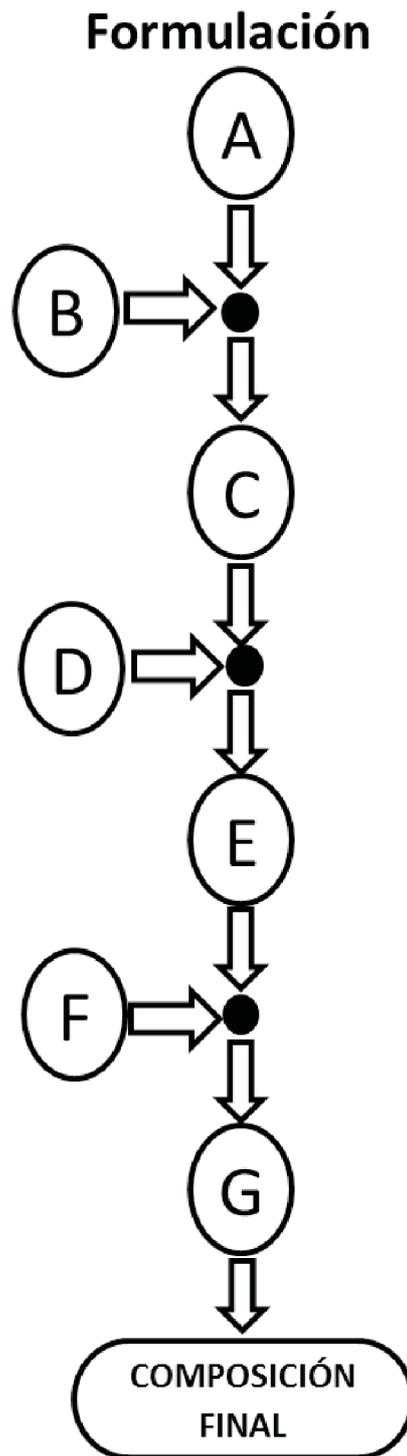


Fig. 1

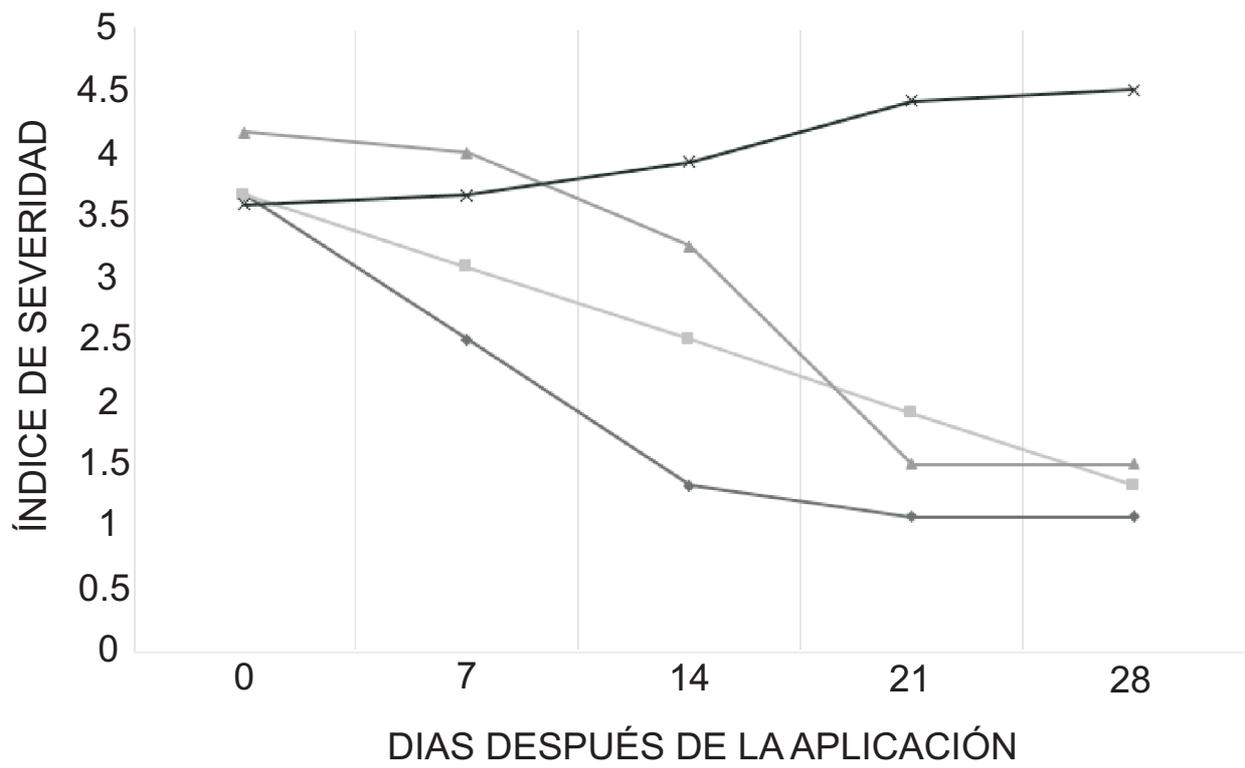


Fig. 2

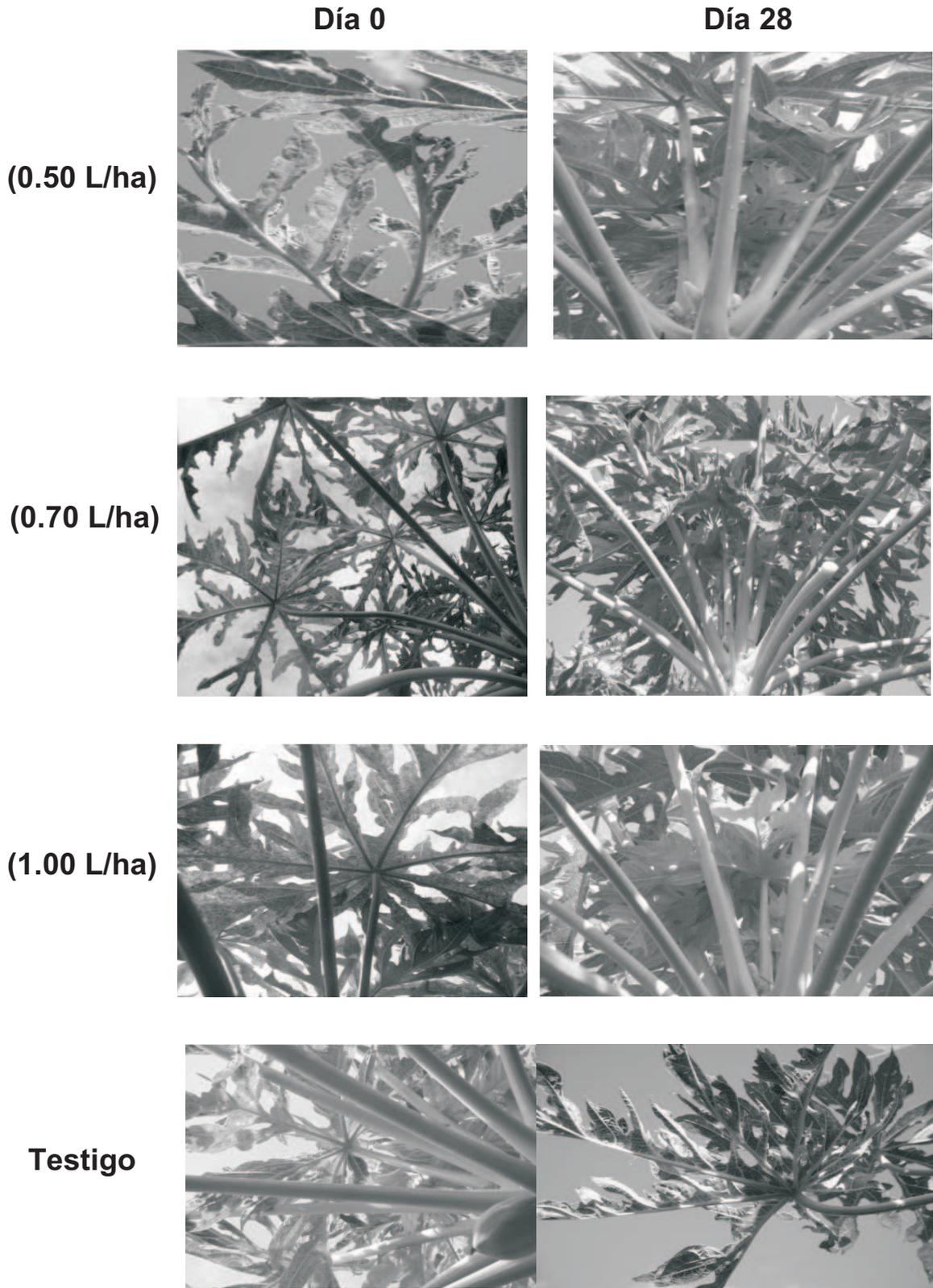


Fig. 3



Fig. 4

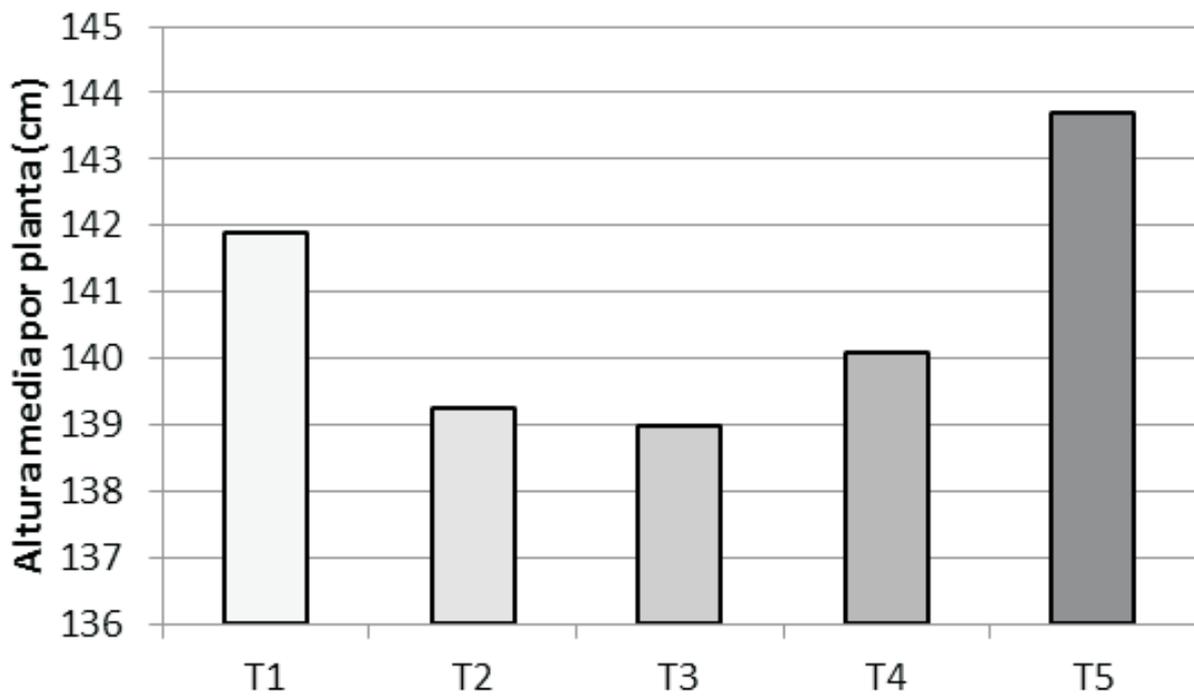


Fig. 5

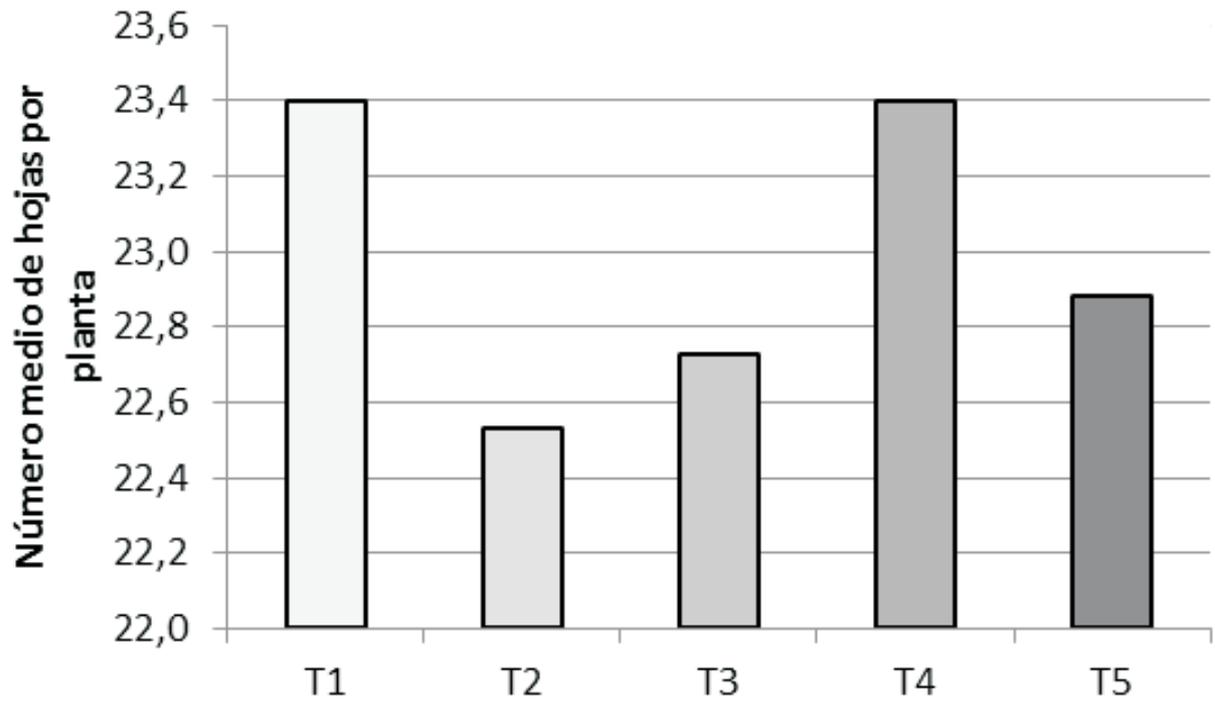


Fig. 6



Fig. 7



Día 0



Día 36

Fig. 8



Día 0



Día 36

Fig. 9



Día 0



Día 36

Fig. 10

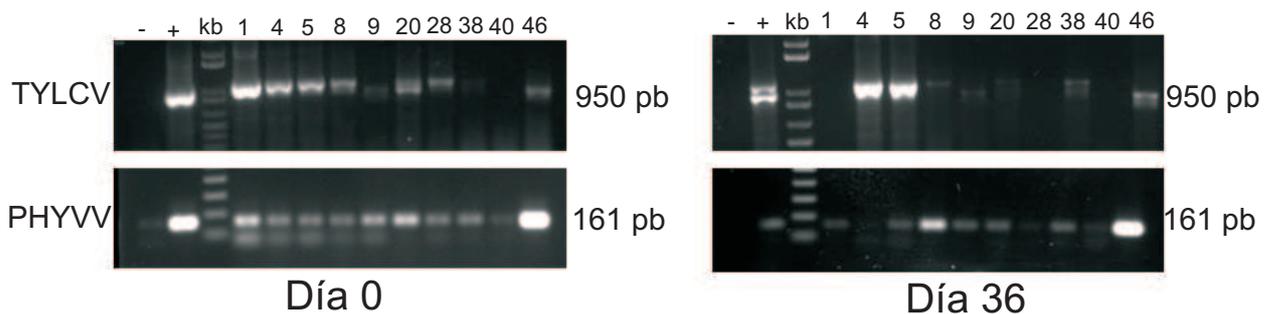


Fig. 11

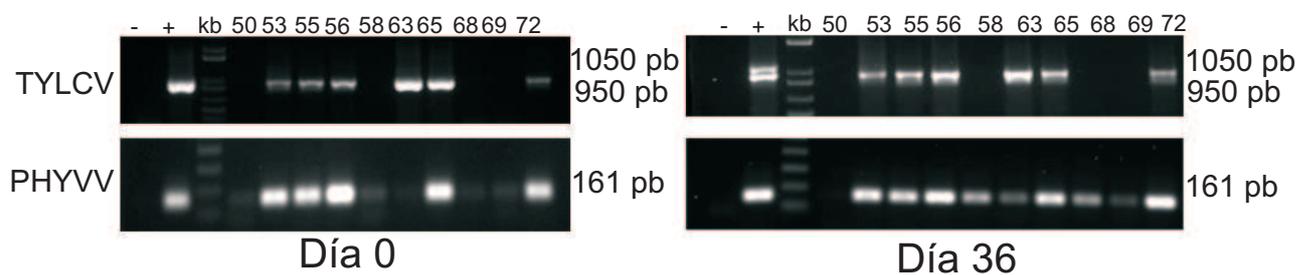


Fig. 12

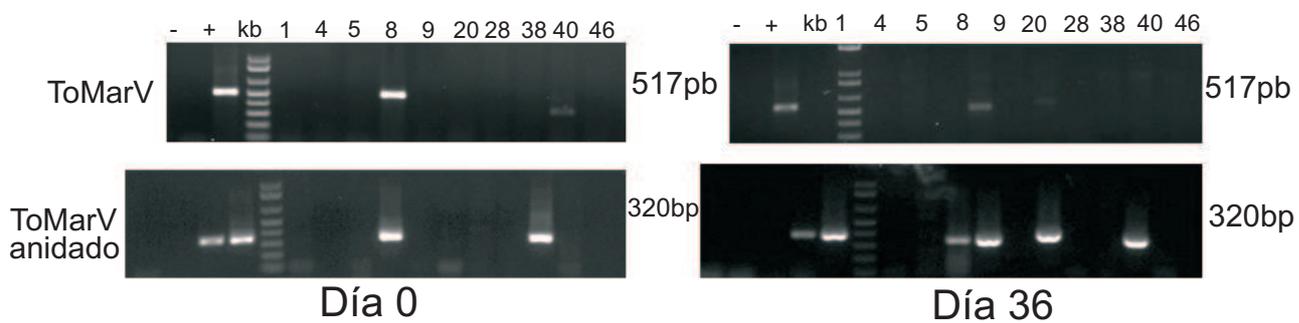


Fig. 13

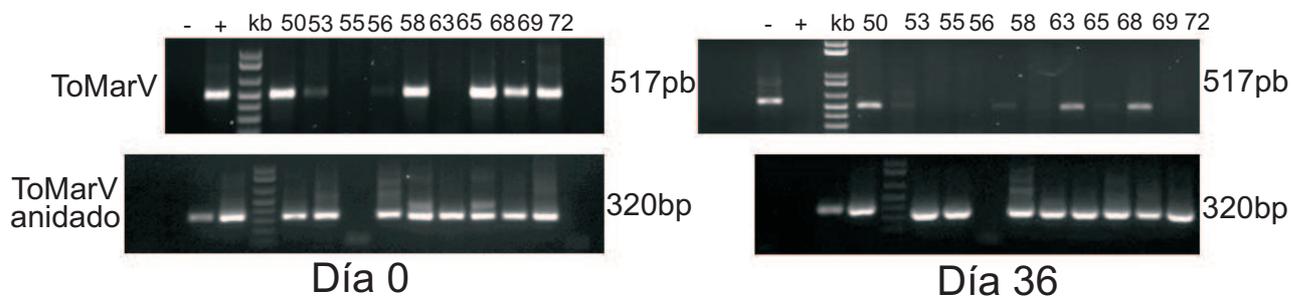


Fig. 14



②① N.º solicitud: 201631369

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.10.2016

③② Fecha de prioridad: **02-02-2016**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MX 2011009769 A (GREENCORP BIORGANIKS DE MEXICO S.A. DE C.V.) 15/03/2013, página 21, línea 3 – página 22, línea 19; página 24, línea 5 – página 26, línea 10.	1-22
A	WO 2010144950 A1 (HURSTWELL PTY LTD [AU/AU]) 23/12/2010, página 20, línea 12 – página 22, línea 16; página 38, línea 22 – página 39, línea 5.	1-22
A	WO 2014020187 A1 (BLUE AGRO BIO SCIENCE S.L. [ES/ES]) 06.02.2014. Página 9, línea 22 – página 10, línea 16.	1-22
A	US 8202557 B1 (DOTY) 19/06/2012. Columna 2, Línea 58 – columna 4, línea 5.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.06.2017

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N65/08 (2009.01)

A01N65/18 (2009.01)

A01N65/22 (2009.01)

A01N65/28 (2009.01)

A01P21/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, A01P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.06.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MX 2011009769 A	15.03.2013
D02	WO 2010144950 A1	23.12.2010
D03	WO 2014020187 A1	06.02.2014
D04	US 8202557 B1	19.06.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una formulación bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal e inductora de resistencia, que contiene extractos y aceites vegetales provenientes de plantas del semidesierto Chihuahuense, aceites absolutos y extractos de plantas aromáticas, aminoácidos y péptidos de origen vegetal y animal, hormonas y vitaminas. Se refiere también a un método de preparación de dicha formulación y a su uso para control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos en cultivos agrícolas (reivindicaciones 1-22).

El documento D01 divulga una composición bactericida e inductora de resistencia, que contiene extractos y aceites vegetales, derivados de origen animal, microorganismos, acondicionadores y diluyentes. Se refiere también a un método de preparación de dicha formulación y a su uso para control de enfermedades causadas por virus fitopatógenos en cultivos agrícolas (ver página 21, línea 3 - página 22, línea 19; página 24, línea 5 - página 26, línea 10).

El documento D02 divulga un método para control de plagas y de organismos patógenos en agricultura, aplicando una composición pesticida que contiene compuestos terpenoides, aceites esenciales, extractos de plantas y/o combinaciones de los mismos (ver página 20, línea 12 - página 22, línea 16; página 38, línea 22 - página 39, línea 5).

El documento D03 divulga una composición bioestimulante sólida, formada por partículas, gránulos y/o pellets que conforman matrices a partir de compuestos de origen mineral o animal, recubiertos e impregnados con una formulación bioestimulante y elicitora basada en extractos de algas; así como su uso para fertilización y tratamiento fitosanitario en agricultura (ver página 9, línea 22 - página 10, línea 16).

El documento D04 divulga una composición bioplaguicida formada por una mezcla de especies naturales nocivas para insectos a través del contacto directo (ver columna 2, línea 58 - columna 4, línea 5).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-22**

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica, ya que anticipa una composición bactericida e inductora de resistencia, que contiene extractos y aceites vegetales junto con derivados de origen animal. Se refiere también a un método de preparación de dicha formulación y a su uso para prevención y control de enfermedades fitopatógenas en cultivos agrícolas.

La principal diferencia entre la formulación reivindicada y la anticipada en D01 radica en el uso de aceites absolutos y extractos de plantas aromáticas entre otros componentes y en su función bioestimulante. Por otra parte, el documento D02 divulga un método para control de plagas y de organismos patógenos en agricultura, aplicando una composición pesticida que contiene aceites esenciales y extractos de plantas.

Encontrándose en el estado de la técnica el uso de extractos y aceites vegetales, y por otra parte de aceites esenciales, en agricultura para crecimiento de plantas y control de enfermedades, se podría considerar que el empleo de extractos y de aceites esenciales una misma composición sería evidente para un experto en la materia. Sin embargo, la composición descrita en D02 no contiene otros de los componentes citados en la formulación reivindicada, no refiriéndose tampoco a una función bioestimulante o inductora de resistencia a ciertas enfermedades fitopatógenas. De este modo, se considera que la combinación de la invención es diferente a lo divulgado y que la solución del problema técnico planteado resulta inventiva.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-22 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (**Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986**)

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.